(Aus der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg: Prof. Dr. R u n g e).

Experimentelle Beiträge zum Krebsproblem

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karl-Universität zu Heidelberg

Vorgelegt von

Lisa Nothdurft und Paul Pfau

Arc Medical Library

1939.

Buchdruckerei Richard Mayr, Würzburg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg.

Dekan:
Prof. Dr. H. Runge.

Referent:
Dozent Dr. H. O. Kleine.

Experimentelle Beiträge zum Krebsproblem.

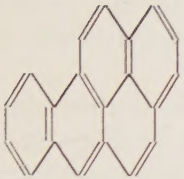
Die Versuche englischer Forscher(1), die zu einer Isolierung ganz spezifischer carcinogener Komponenten aus Teer führten, lassen viele Versuche früherer Zeiten in einem neuen Licht erscheinen. Die ersten Ergebnisse, experimentell beim Tier Krebs zu erzeugen, konnten während des Weltkrieges die Japaner Yamagiva und Ischikawa (2) vorlegen. Nach vielen erfolglosen Versuchen zahlreicher Forscher war es ihnen wegen größerer Ausdauer gelungen, beim Kaninchen und bald auch bei der weißen Maus durch immer wiederholte Hautpinselungen mit Teer typische Hautcarcinome mit allen histologischen Kennzeichen und relativ häufigen Metastasen in alle möglichen Organe zu erreichen.

Diese Versuche wurden sehr häufig mit dem gleichen Ergebnis nachgeprüft. Man sah darin eine glanzvolle Bestätigung der Auffassung Virchows von der Bedeutung fortgesetzter, chronischer Reizung für die Entstehung auch des menschlichen Krebses. Zwar war es schon vorher gelegentlich aber nie regelmäßig reproduzierbar, bei Reizversuchen am Tier mit verschiedenen Substanzen zu Krebsbildung gekommen, aber dies waren jeweils unter vielen Versuchen seltene, unerklärliche Einzelfälle. Nur mit Arsen und durch Infektion mit bestimmten Parasiten (3) ließen sich mit einiger Regelmäßigkeit Krebse erzeugen. Bei allen Parasiten-Infektionen sei der unspezifische Charakter dieser vielfachen „Krebserreger" hervorgehoben. Die experimentelle Erzeugung von Krebs mittels Arsen und solchen Parasiten ist aber wegen der großen Unsicherheit und geringen Ausbeute nicht zu vergleichen mit den regelmäßigen positiven Ergebnissen bei Pinselung mit Teer, wo bis zu 100% (4) der mehrere Monate überlebenden Tiere echte Krebse an der Pinselstelle entwickeln. Deshalb wurde die experimentelle Krebserzeugung mit Teer besonders bei der

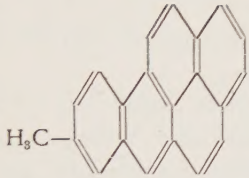
weißen Maus zu einer Standardmethode aller Krebsforschungslaboratorien. Zahlreiche pathologische Untersuchungen (5) wiesen den besonders bösartigen, und am ehesten dem menschlichen Carcinom vergleichbaren Charakter des experimentellen Teerkrebses nach und zeigten seine wesentliche Unterscheidung von allen Arten von Impfkrebsen, die, im Gegensatz zur echten Krebsbildung aus den mit Teer behandelten Zellen, nicht etwa eine Neuentstehung von Krebs aus den Zellen des geimpften Tieres bedeuten, sondern mindestens großteils ein einfaches Weiterwachsen des körperfremden Implantates darstellen. Gleichzeitig wiesen die Untersucher auf die Notwendigkeit besonderer Vorsicht in der Beurteilung krebsähnlicher Wucherungen hin, die durch die verschiedenartigsten Substanzen bei chronischer Reizung hervorgerufen werden können, mit echtem Krebs jedoch nichts zu tun haben. Die Frage der Bewertung sogenannter „Vorstadien" des Krebses ist danach so entschieden, daß es bis jetzt mit keiner histologischen Methode und auch sonst nicht möglich ist, Wucherungen, die dauernd gutartig bleiben, von solchen zu unterscheiden, die regelmäßig normaler Krebsentwicklung vorausgehen, also nachträglich als Vorstadien bezeichnet werden können. Es gibt nur die sichere Diagnose „Krebs". Vor allen „Vorstadien" ist nie sicher zu sagen, ob sie tatsächlich zu Krebs werden oder gutartig bleiben.

Die Ergebnisse der Teerpinselungen in der ganzen Welt zeigten aber doch sehr bald, daß die einzelnen Teerarten die krebserzeugende Wirkung in ganz verschiedenem Maße besitzen: während manche Teere seltene oder gar keine positiven Ergebnisse zeigten, hatten andere besonders ausgesprochen carcinogene Wirkung. Das führte bald zu der Annahme, daß die krebserregende Eigenschaft nicht dem Gesamtteer, sondern bestimmten Fraktionen zukommt.

Als erste erhielten B l o c h und W i d m e r (6) in den über 300 Grad und höher siedenden Fraktionen besonders wirksame Teerdestillate, in denen sie hochmolekulare, aromatische Kohlenwasserstoffe als wirksame Substanzen vermuteten. Den eingangs erwähnten englischen Forschern (1) ist dann die Isolierung aus dem Teer und die synthetische Darstellung solcher krebserregenden Kohlenwasserstoffe gelungen. Als carcinogener Faktor des Teers wurde dabei der Kohlenwasserstoff 3,4 Benzpyren (deutsche Nomenklatur) (I.) gefunden.

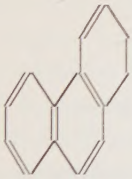


I. 3, 4 Benzpyren.



II. Methylbenzpyren.

Fast 300 Synthesen ähnlicher Kohlenwasserstoffe verschiedenster Art führten bisher zur Entdeckung von etwa 40 krebserregenden Kohlenwasserstoffen, laufend wird über neue Krebserregerstoffe berichtet. Fast allen diesen Stoffen, wie auch dem 3,4 Benzpyren, ist als chemisches Charakteristikum das Phenanthrenskelett eigen.



III. Phenanthren.

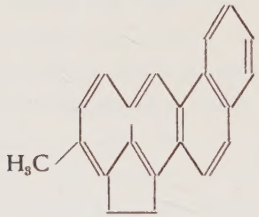
Die krebserregende Wirkung jedes einzelnen Stoffes zeigte sich dabei äußerst spezifisch. Zwar haben die verschiedensten Substanzen mit dem Phenanthrenskelett in mehr oder weniger ausgesprochenem Maße krebserregende Wirkung, aber geringste Änderungen im Molekül lassen überraschend ihre krebserregende Wirkung verschwinden. Die einfache Einführung einer Methylgruppe in das Benzpyrenmolekül zerstört dessen besonders ausgeprägte Wirkung. (II.)

Als auffallendes Ergebnis dieser Arbeiten ist also hervorzuheben, daß die krebserregende Wirkung des Teers nicht etwa dem ganzen Teer, sondern ganz bestimmten, jetzt auch chemisch rein darstellbaren Stoffen zukommt, und in ihnen wieder in ganz bestimmten Molekülstrukturen bedingt ist.

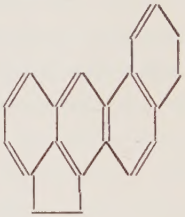
Es sei schon jetzt hervorgehoben, daß zur Krebserzeugung nur Benzpyren als reinste, synthetische Substanz nötig ist. Die carcinogene Wirkung des Teers beruht auf der Gegenwart dieses Stoffes. Teere ohne diese — wenn auch geringe — Beimengung sind ohne

krebserregende Wirkung. All die zahlreichen übrigen Bestandteile des Teers außer Benzpyren sind für die Krebsentstehung unwesentliche Begleitkörper.

Eine besondere Bedeutung erhielten die Krebserregerstoffe durch ihre nahe chemische Verwandtschaft zu bestimmten, im tierischen und menschlichen Organismus in großer Menge vorkommenden Stoffklassen (Gallensäuren, Sterine, Sexualhormone). Gerade für die aktivsten, der bis jetzt gefundenen Stoffe Methylcholanthren (IV.) und Cholanthren (V.) konnte Cook die besonders nahe Verwandt-



IV. Methylcholanthren.



V. Cholanthren.

schaft zu Körpersubstanzen nachweisen. Im Reagenzglas konnte aus Desoxycholsäure, die im Organismus in reicher Menge vorkommt, das stark carcinogene Methylcholanthren durch allmählichen Abbau der Seitenketten und durch Ringschluß dargestellt werden.

Die dabei nötigen chemischen Änderungen sind, was den Abbau der Seitenketten betrifft, im Körper sicher nachgewiesen, bezüglich des Ringschlusses sind sie zwar nicht sicher bewiesen, aber als notwendig anzunehmen. Demnach ergibt sich die Möglichkeit, daß auch im Organismus solche oder ähnliche krebserregende Stoffe als Produkt eines pathologischen Stoffwechsels auftreten können, worauf die Entdecker schon hinwiesen (1). Die enorme Bedeutung des tatsächlichen Nachweises solcher Stoffe liegt auf der Hand. Gerade für den menschlichen Krebs erscheinen uns die Ergebnisse dieser englischen Arbeiten nach verschiedenen Seiten bemerkenswert:

Es ist in Anbetracht der geringen zur Krebserzeugung nötigen Substanzmengen — mit weniger also 0,4 γ des relativ schwach wirksamen Dibenzanthren wurde bei der Ratte ein Krebs erzielt (7) — zu prüfen, in wieweit solche Stoffe durch Zufuhr von außen als Erreger menschlicher Krebsarten in Frage kommen. Schon seit vielen Jahr-

zehnten weiß man, daß bestimmte Berufskrebse (Schornsteinfeger, Brikettarbeiter, Teerarbeiter) durch äußere Einwirkung von Teerprodukten entstehen. Hier verursachen also solche Substanzen offensichtlich bestimmte Krebse, die sich in ihrer Bösartigkeit von andern klinisch und pathologisch nicht unterscheiden. Es ist nun nach dem Nachweis so hochwirksamer chemischer Stoffe durchaus denkbar, daß auch andere Krebse des Menschen auf der langdauernden Zufuhr sehr kleiner, schwer nachweisbarer Mengen solcher Substanzen beruhen. Zunächst werden dafür neben den Hautkrebsen, die Krebse der äußeren Einwirkungen besonders ausgesetzten gesamten Luftwege und der Lungen, sowie von Mund und Ösophagus in Frage kommen. Für diese Krebsarten findet man ja schon immer verschiedenste äußere Einwirkungen, ohne eigentlichen Beweis, als Ursache erwähnt, (Lippenkrebs, Zungenkrebs durch Pfeifenrauchen und Absinth?, Lungenkrebs durch Abgase? und so weiter). A. H. Roffo (8) konnte zeigen, daß die Einatmung von Terrprodukten in geteerten Großstadtstraßen, direkt hinter einem Motorwagen, nur wenige mg betrage. Eine Wirkung dieser Mengen ist denkbar, aber wegen der Unmöglichkeit des Nachweises, nicht zu diskutieren. Dahingegen wies Roffo nach, daß beim Rauchen, besonders von schweren Kentucky Zigarren, das Vielhundertfache von Teerprodukten eingeatmet wird. Er konnte durch den Rauch von Zigarren, ähnlich wie er beim normalen Rauchen entsteht, am Kaninchenohr durch tägliche Einwirkung von nur 2—3 Minuten ein echtes, metastasierendes Carcinom erzeugen. In Destillationsprodukten des Tabaks, die nun allerdings, wie Roffo fälschlicher Weise annimmt, nicht mehr mit dem Rauch der Zigarre vergleichbar sind, konnte er in beträchtlicher Menge krebserregende Stoffe nachweisen, die bei fast 100% der gepinselten Mäuse und Kaninchen zu Krebs führten. Durch die blaue Fluorescenz und bestimmte chemische Eigenschaften konnte er die Identität mit den oben erwähnten Kohlenwasserstoffen wahrscheinlich machen. Ausgedehnte, statistische Untersuchungen Roffos über die Häufigkeit der Krebse der Luftwege und der Speiseröhre ergaben unter besonderer Berücksichtigung der rauchenden Frauen, eine überraschende Bevorzugung der Raucher, wenn auch dabei, wie bei all derartigen statistischen Erhebungen, große Vorsicht in der Beurteilung nötig ist. Auf die gegenteiligen Befunde von Schürch

und Winterstein (9) sei hingewiesen. In einem andern Falle konnte die Bildung solcher krebserregender Stoffe im Körper sogar nachgewiesen werden. Nicht nur wie allgemein bekannt, durch Röntgenstrahlen, auch durch chronische Ultraviolettbestrahlungen lassen sich bei Tieren mit hoher Ausbeute Hautkrebse besonders an Augen und Ohren erzeugen. Cook hat bereits auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Röntgenstrahlen ihre carcinogene Wirkung durch Umwandlung körpereigener Sterine in carcinogene Stoffe verdanken könnten, etwa entsprechend der Umwandlung von biologisch unwirksamen Ergosterin in antirachitisches Vitamin D. Domagk (10) konnte, in einer vorläufigen Erwähnung, in röntgenbestrahlter Rattenhaut keine carcinogenen Substanzen nachweisen. Dagegen hat Roffo in der mit Ultraviolett bestrahlten Haut das Auftreten blau fluoreszierender Stoffe festgestellt, die, zunächst noch unrein, die chemischen und physikalischen Eigenschaften der genannten Kohlenwasserstoffe zeigen. Hier ist also für diesen Krebs, dem durchaus der Gesichtskrebs der Seeleute und der Landarbeiter vergleichbar erscheint, das Dazwischentreten dieser Substanzen [1]), erstmals im Organismus selbst entstehend, sehr wahrscheinlich gemacht worden. Für den Blasenkrebs der Anilinarbeiter wird neuerdings von Schürch und Winterstein (11) eine mit dieser Gruppe strukturähnliche Base verantwortlich gemacht.

Es ergibt sich also die Feststellung, daß außer für die schon lange als besondere Krebsformen angesehenen menschlichen Reizkrebse, die mit der äußeren Zufuhr solcher Substanzen sicher zusammenhängen, auch für einige weitere Arten des Krebses die Zufuhr solcher Stoffe von außen als Ursache sehr in Frage kommt. Es entsteht also aus der Entdeckung dieser Stoffe die Notwendigkeit der Prüfung und Verhinderung ihres Auftretens in allen für die Benutzung durch Menschen bestimmten Ingredienzien. Zumal für bestimmte Behand-

[1]) Unsere eigenen Versuche haben uns bei der Anerkennung blau fluoreszierender Stoffe als Krebserreger, sogar dann, wenn diese Stoffe erst nach Zufuhr eines krebserregenden Kohlenwasserstoffes auftraten, sehr vorsichtig gemacht. Wir konnten ätherlösliche, blau fluoreszierende Stoffe aus allen möglichen normalen Geweben ebenfalls extrahieren, also auch aus normalen nicht bestrahlten Mäuseohren.

lungsarten mit Teer und seinen Produkten wird heute die Kenntnis der carcinogenen Substanzen einschränkend sein müssen. Das Auftreten von Krebs gerade bei solchen chronischen dermatologischen Erkrankungen, die mit Teer und Teerprodukten behandelt werden, erscheint uns eines Hinweises wert. Eine statistische Untersuchung über das Vorkommen von Krebs bei Ekzem mit und ohne Teerbehandlung konnten wir nicht finden, obgleich neuerdings die dermatologische Praxis die unkontrollierbare Teerbehandlung wegen der Gefahr des Reizkrebses vermeidet.

Es ist also festzuhalten, daß diese krebserregenden Substanzen als ursächliches Moment auch für solche menschlichen Krebse in Frage kommen, für die das nicht, wie etwa für den Schornsteinfegerkrebs, ohne weiteres auf der Hand lag, die vielmehr den inneren Krebsen gleich zu setzen sind. Der Krebs des Menschen entsteht demnach durch das Dezwischentreten krebserregender Substanzen, entweder so, daß diese Stoffe von außen zugeführt werden oder so, daß sie vom Organismus gebildet werden. Die Frage nach der causalen Genese des Krebses wird durch diese Hypothese nicht berührt.

Das Auftreten zahlloser chemischer Stoffe im Organismus von ähnlicher Struktur wie diese carcinogenen Kohlenwasserstoffe legt die Vorstellung, daß auch im Organismus krebserregende Stoffe auftreten können, sehr nahe. Sie ist heute zu einer allgemein verbreiteten Anschauung geworden. Noch bevor besonders in der deutschen Literatur diese Vorstellung klar ausgesprochen war, haben wir auf die Andeutung der englischen Forscher hin, diese Grundvorstellung übernommen und nun für den speziellen Fall des Gebärmutterkrebses versucht, im Körper entstandene krebserregende Stoffe tatsächlich nachzuweisen. So sicher anzunehmen ist, daß an vielen Orten der Nachweis solcher Substanzen versucht wird, haben wir bisher keinerlei Untersuchungen über diesen Gegenstand kennen gelernt. Hierher gehört höchstens eine Erwähnung von M. Bürger und R. Uiker (12), die mit Gallensubstanzen von Krebspatienten, später auch von andern Kranken, und mit normalen Gallen Leukämie-artige Gewebsveränderungen erzielten. Die Autoren sprechen tatsächlich davon, daß es sich um die Wirkung krebserregender Substanzen handeln könnte, wenn auch die Verwendung von Gallen, die von nicht Krebspatienten und von Tieren stammen, dies ausschließen sollte.

Wir wählten den Gebärmutterkrebs für die ersten Versuche des Nachweises, weil gerade bei der Bildung der Sexualhormone aus Sterinen, die ja über viele Zwischenstufen im Organismus stattfinden muß, besonders viele Möglichkeiten zur Bildung von Phenanthrenabkömmlingen bestehen. Die Bereitschaft zur Krebsbildung könnte nun darin bestehen, daß durch Störung dieses Sterinstoffwechsels statt normaler Sexualhormone krebserregende „Fehlhormone" oder „Falschhormone" entstehen. Sei es, daß die Störung neu auftretende, normalerweise nicht gebildete Stoffe mit carcinogener Wirkung erst neu entstehen läßt, oder daß normalerweise schon als Zwischenprodukt zu den Sexualhormonen intermediär solche Stoffe entstehen, infolge von Störungen aber dann nicht mehr, oder nicht mehr so rasch weitergebildet werden. Infolge ihrer Ähnlichkeit mit den Sexualhormonen würden diese Stoffe eben nicht i r g e n d w o im Körper, sondern in der Gebärmutter zur Wirkung kommen. Durch einen Falschaufbau in irgend einer Seitenkette werden sie krebserregend. Die vielen Zusammenhänge zwischen Genitalgeschehen und Krebs wären somit leicht verständlich. Gleichzeitig wäre zu erwarten, daß diese Fehlhormone ebenso wie die normalen Sexualhormone im Harn ausgeschieden und somit faßbar wären, während für andere Krebse die Ausscheidung im Urin keineswegs zu fordern wäre. In der Zwischenzeit konnten wir an einem andern Beispiel die Fruchtbarkeit dieser Annahme der Verwandtschaft gerade zu den Sexualhormonen zeigen. Künstlich zugeführtes Benzpyren verhält sich in mehrfacher Hinsicht im Organismus tatsächlich wie die Sexualhormone, wie wir an anderer Stelle näher ausführen werden.

Wir versuchten, aus 500 Liter Harn von Patientinnen mit Gebärmutterkrebs, meist fortgeschrittener Stadien, carcinogene Substanzen nachzuweisen. Es waren sehr viele Patientinnen darunter, die bestrahlt wurden oder schon waren. Bei der geringen Zahl von Patientinnen mit unbehandelten Gebärmutterkrebsen, die in Heidelberg verfügbar waren, konnte auf dieses summarische Arbeiten leider nicht verzichtet werden. Der Harn wurde in großen Flaschen gesammelt, dann mit der Wasserstrahlpumpe in großen Nutschen abgesaugt und filtriert, im Vacuum der Wasserstrahlpumpe unter 50 Grad Celsius auf die Hälfte eingedämpft. Der so konzentrierte Harn wurde in Portionen zu je 5 Liter jeweils 4 mal mit je 5 Liter Äther bei Zimmer-

temperatur 20 Minuten lang extrahiert. Da zur Extraktion so großer Mengen eine mechanische Schütteleinrichtung nicht beschafft werden konnte, mußten die ganzen Extraktionen in einer 20-Literflasche von Hand bewerkstelligt werden. Die Flasche lag in einer freischwingend aufgehängten Kiste und der Inhalt wurde durch dauerndes, unregelmäßiges Bewegen kräftig durcheinander geschüttelt. Da die gesamte Urinmenge mit der 4-fachen Menge Äther ausgeschüttelt werden mußte, wären eigentlich 2000 Liter Äther nötig gewesen. Wegen der großen Ausgabe für den benutzten Narkoseäther mußten wir den Äther nach der Extraktion durch Rückdestillation wieder gewinnen. Die Rückdestillation geschah in einem 10-Literkolben bei 55 Grad Celsius. Im Ganzen verbrauchten wir 75 Liter Äther, die also mehr als 25 mal umdestilliert werden mußten [2]). Das Arbeiten mit so großen Harn- und Äthermengen unter den nötigen Vorsichtsmaßregeln verursachte unter den gegebenen Bedingungen große Schwierigkeiten. In dem Kolben, in dem der Äther abdestilliert wurde, blieb ein zäher, öliger Rest zurück, der jeweils von etwa 20—30 Litern Harn im Kolben gesammelt wurde und dann mit Alkohol vom Boden des Destillationskolbens heraus gelöst wurde. Das so gewonnene Alkohol-haltige Öl wurde zunächst an der Luft, dann im Exsikkator zu einer zähen, fast teerartigen Masse eingedickt. Es wurde darauf verzichtet, mit diesem Material weitere chemische Operationen vorzunehmen, da man ja gar nicht wissen konnte in welcher Richtung wirksame Stoffe zu suchen waren. Im ganzen erhielten wir aus 500 Liter Harn etwa 150 ccm dieses Materials. Wir pinselten damit täglich die Nackenhaut von 20 Mäusen bis zum Spontantod der Tiere. Das Material wurde dazu etwas flüssiger gemacht. 4 Tiere, die schon nach wenigen Pinselungen eingegangen waren, wurden durch neue ersetzt. Außer Sonntags wurde täglich gepinselt. Einige Male, wenn die Tiere im Allgemeinzustand zu stark herabgekommen waren, wurden Pausen von einigen Tagen eingeschaltet, in denen sich die Tiere schnell erholten. Bei der Ernährung wurde auch auf die Zufuhr von Vitaminen geachtet. An der Pinselungsstelle im Genick fielen die Haare sehr bald aus, es bildeten sich leichte Abschilferungen und Verhornungen, die Haut sah gelegentlich etwas entzündet aus.

---

2) Die Ätherextraktion- und Rückdestillation wurde durch das Entgegenkommen von Herrn Professor Achelis im Physiologischen-Institut ermöglicht.

Diese haarlosen Stellen bekamen trotz fortgesetzter Pinselung wieder Haare, die wieder ausfielen und so weiter. Zusammengebackene Haare täuschten oft Wucherungen der Haut vor. Nach einiger Zeit fielen die Haare und der mit ihnen verbackene Extrakt als trockene Kruste ab. Die Haut darunter war dann leicht entzündet. Außer ganz kleinen Unebenheiten der Haut traten richtige Wucherungen, wie wir sie bei Teer- und Benzpyren- oder Methylcholanthrenpinselungen sahen, nicht auf. Die Haut der Pinselstelle und die wichtigsten Organe aller Tiere wurden histologisch untersucht, weil mit der Möglichkeit von Krebsentwicklung fern von der Einwirkungsstelle — ähnlich dem Blasenkrebs der Anilinarbeiter — gerechnet werden mußte. Gleichzeitig wurde eine Vergleichsserie von 20 Tieren, die mit Benzpyren behandelt wurden und größtenteils richtige Carcinome entwickelt hatten, in gleicher Weise untersucht. Wir erhielten so eine eingehende Kenntnis der Gewebsveränderung, die viele Organe solcher Tiere nach Benzpyren- und Harnextraktpinselung zeigen.

Das sehr zahlreiche histologische Material [3]) über die Veränderungen fast aller Organe durch das B e n z p y r e n wird an anderer Stelle ausgewertet. Es sei jedoch auch hier hervorgehoben, daß alle Organveränderungen, von den häufigen Metastasen abgesehen, nicht als krebsspezifisch zu betrachten sind.

Die histologischen Befunde der mit H a r n gepinselten Tiere ergab bezüglich der Organe ähnliche histologische Bilder. Weil die Wirkung eventueller krebserregender Fehlhormone erst nach Monaten erwartet werden konnte, und gerade die am längsten lebenden Tiere am meisten Aussicht boten, einen Krebs zu bekommen, mußte der Spontantod der Tiere abgewartet werden, der meist unter dem Bilde der Sepsis erfolgte. Die gefundenen Organveränderungen entsprechen meist Vorgängen kurz vor dem Tode der Tiere, dazu kamen chronische Schädigungen durch eine Unzahl von Stoffen, die in unseren Rohextrakten enthalten waren. Daß viele Organveränderungen der Tiere mit Benzpyrenkrebs sich bei mit Harnextrakt gepinselten Tieren wieder fanden, zeigt nur, daß meist die direkte Todesursache bei beiden Serien gleich, aber keinesfalls durch den Krebs bedingt war.

[3]) Fräulein A. Schwind vom Laboratorium der Universitätsfrauenklinik gebührt für die sorgfältige Anfertigung und Färbung der Schnitte unser besonderer Dank.

In der Leber waren herdförmige Parenchymdegenerationen, leucocytäre Infiltrate, alte Nekrosen, eitrige Thromben bis zum Bild einer allgemeinen, chronischen Hepatitis oder einer septischen Leber. In keinem Fall war die Leber normal.

Die Nieren zeigten herdförmige bis ausgedehnte Degenerationen, gelegentlich auch entzündliche Infiltrate. Degenerationen der Glomeruli und der Tubuli herrschten vor. Bei einigen Tieren waren die Nieren unverändert. In den ersten Wochen der Pinselung hatte eine Kontrolle des Urins kein Eiweiß ergeben. Die Untersuchung des Urins auf Eiweiß wurde nicht bis zum Tod der Tiere ausgedehnt. Sicher mußten nach dem histologischen Bild der Nieren ein Teil der Tiere schwere Funktionsstörungen zu Lebzeiten gehabt haben. Bei den Tieren mit Benzpyren haben wir nachträglich auf das Auftreten von Eiweiß im Urin solcher oft gepinselten Tiere geachtet und festgestellt, daß Tiere häufig schon nach Pinselung mit Benzol allein, das ja meistens als Lösungsmittel für irgend welche auf ihre Wirkung zu untersuchenden Substanzen benutzt wird, schon nach wenig Pinselungen Eiweiß im Urin zeigen können, daß andererseits Benzpyrentiere Carcinom tragen können, ohne daß sie Eiweiß aufweisen. Andererseits sahen wir auch bei Tieren, die kristallinisches Benzpyren ohne Lösungsmittel unter die Haut gelegt bekamen, nach einigen Tagen Eiweiß im Urin. Es ist also so, daß sowohl Lösungsmittel als auch Krebserregersubstanzen für sich allein Nierenschädigungen hervorrufen können. Die Nierenschädigung durch die Krebserregersubstanz allein hat offenbar mit der krebserregenden Eigenschaft des Stoffes nichts zu tun.

Die Milz war gegenüber der normaler Tiere, wie genaue Vergleiche des Organgewichts ergaben, wenig vergrößert. Wir hatten darauf geachtet, weil die Milz der Benzpyrentiere oft, wohl sicher weniger durch den Krebs an sich als durch den zerfallenden und infizierten Tumor, enorm vergrößert war. Histologisch zeigten sich bei den Harnmäusen in fast allen Fällen starke Hyalinisierung der Balken, die Lymphfollikel erschienen ohne helle Zentren und waren oft überhaupt nicht als einzelne Knötchen zu unterscheiden.

Die Lungen waren bei der Mehrzahl der Tiere nie verändert. Ein Tier hatte eine Bronchopneumonie, einige zeigten das Bild einer chronischen Stauung.

Die Nebennieren der Tiere zeigten überall eine mächtige Entwicklung des Markes, während die Rinde eher schwach entwickelt erschien. Unsere Benzpyrentiere zeigten ebensolche Verschiebungen der Markgröße gegen die Rinde. Ogleich diese Veränderungen nach Ausschluß aller Nebenbeeinflussungen mit quantitativen Untersuchungsmethoden gesichert werden müßten, erwähnen wir einige Kombinationen, die wir daran knüpften: Aus ganz anderen Untersuchungen ist uns das motorische Verhalten weißer Mäuse sehr genau bekannt (13). Unsere Tiere, die mit Harnextrakt gepinselt waren, erschienen gegenüber normalen Tieren zunehmend immer weniger lebhaft, obgleich die Pinselungsstelle sicher genau so gereizt war wie bei den Benzpyrentieren, die im Gegensatz dazu von abnormer Lebhaftigkeit bis in die letzten Lebenstage waren. Ihre Munterkeit und dauernde Beweglichkeit erschien bei den Wucherungen mit zum Teil enormen Ausmaßen geradezu grotesk. Dabei handelt es sich sicher nicht um Unterschiede des lokalen Reizes. Kurz nach der Pinselung reagierten sowohl Benzpyren- als auch Harnmäuse in gleicher Weise, mit lebhaften Abwehrbewegungen, die allerdings offensichtlich durch den lokalen Reiz bewirkt wurde. Wir möchten zunächst ohne Beweismöglichkeit in Veränderungen gerade der Nebennieren die Begründung dieser motorischen Störungen sehen, obgleich die histologischen Befunde der Nebennieren der beiden Serien nicht so deutlich gegensätzlich waren, wie das motorische Verhalten.

Ovarien und Hoden haben wir besonders genau betrachtet wegen der schon geschilderten Beziehung der vermuteten Carcinogene gerade zu den Sterinverwandten Sexualhormonen, ferner weil unser Harnextrakt ja auch Follikelhormon und eventuell andere uteruswirksame Hormone enthielt. Diesen Gehalt unseres Extraktes an Follikelhormonen haben wir an kastrierten, weißen Mäusen getestet, worauf wir noch zurückkommen. Die percutane Aufnahme bei der Harnextraktpinselung, wobei aus Sparsamkeit mit dem Material jeweils nur eine kleine Stelle am Nacken gepinselt wurde, wurde an den Versuchstieren selbst geprüft. Im Allen-Doisy-Test fand sich bei ihnen trotz der täglichen Pinselungen mit dem follikulinhaltigen Harnextrakt kein Daueröstrus, sondern ein normaler Cyklus von 3 bis 4 Tagen.

Die histologischen Befunde bei den Ovarien waren nicht einheitlich. Von 6 untersuchten, weiblichen Tieren zeigten bei zwei Tieren die Ovarien das Bild voll funktionierender Organe. Korpora lutea fanden sich nicht. Drei Tiere zeigten neben vielen Follikeln größere, bereits organisierte, ältere Blutungen. Ein Organ zeigte wenig Follikel und sehr viel Bindegewebe. Eine wesentliche Funktionsstörung lag also nur in einem Falle vor. Dieses Tier hatte nicht etwa viele Pinselungen erhalten. Nach einer ganz neuen Arbeit von Brock, Druckrey und Hamperl (14) finden sich nach Benzpyreninjektionen histologisch ausgedehnte Rückbildungen der Hoden und der Ovarien, die sich aber wieder völlig zurückbilden. Obgleich man aus der geringen Anzahl unserer Tiere diese Frage nicht entscheiden könnte, so fügen sich doch die Befunde an den Ovarien einem solchen gestuften Ablauf. Sowohl bei den mit Harnextrakt gepinselten Tieren, als auch bei den Benzpyrentieren, haben wir in den ersten 4 Wochen der Pinselung und zu einem späteren Termin, als die Benzpyrentiere schon Carcinome trugen, den Scheidenabstrich verfolgt und durchwegs normalen Östruscyklus festgestellt. Die Periode der Genitalschädigung möchte allerdings gerade für die Zwischenzeit angenommen werden, in der keine Östruskontrolle stattfand. Die Hoden von 10 Tieren waren völlig normal und in voller Funktion. Irgendeine Hodenschädigung ließ sich nicht feststellen.

Hinsichtlich einiger sehr leicht irreführender Befunde durch Parasiten sei nur erwähnt, daß sie recht häufig sind und daß man immer an sie denken muß. Krebs oder Tumorbildung fand sich in keinem Organ. Die Haut an der Pinselstelle, wo sich besonders die carcinogene Wirkung der Harnextrakte zeigen sollte, ergab bei fast allen Tieren nur verdicktes Epithel und schwielige Verdickung des darunter befindlichen Bindegewebes. Eine ausgesprochene Zellunruhe mit ungleichen Kernen und vielen Kernteilungen ist im Epithel und im Bindegewebe vorhanden. Dagegen zeigten 3 Tiere stärkere Veränderungen, die durchaus als „praecarcinomatös" zu bezeichnen sind. Die Epithelzellen zeigten histologisch richtige papillöse Wucherungen mit in die Tiefe dringenden Zellzapfen, in einem Präparat finden sich echte Hornperlen. Verhornte Plattenepithelzellnester dringen tief ins subkutane Gewebe vor. Es handelt sich jedoch in keinem Fall um Krebs. Es zeigt sich, daß gerade die am längsten gepinselten Tiere

die geringsten Veränderungen aufweisen, während die drei „Vorstadien" gerade bei den Tieren mit nur 26, 36 und 43 Pinselungen bestanden. Bezüglich der Bewertung solcher „Vorstadien" ist schon eingangs hervorgehoben, daß aus dem histologischen Bild nicht zu entscheiden ist, ob es sich um wieder zurückgehende, also gutartige Wucherungen oder um tatsächliche Krebsvorstadien handelt. Immerhin zeigen diese 3 Tiere Veränderungen der Haut, wie sie tatsächlich als erste Stadien des echten Teerkrebses auftreten, wo natürlich aus dem histologischen Bild ebensowenig etwas über die Weiterentwicklung sich sagen läßt. Solche Bilder treten bei Teerpinselung aber frühestens nach 7—8 Wochen auf, während bei uns gerade die weitestgehende Veränderung sich bei einem Tier findet, das in der Zeit vom 15. X. 36 bis 12. XI. 36 also in 28 Tagen 26 mal gepinselt war. So rasche „praecanceröse" Veränderungen sind selbst bei einem sehr aktiven Teer in der gleichen Zeit nicht zu erzielen. Unsere Annahme, bei fortgesetzter Pinselung nun auch Weiterentwicklung zu Krebsen zu sehen, bestätigte sich jedoch nicht. Vielmehr zeigte die Haut mit der steigenden Anzahl der Pinselungen histologisch immer geringere Reaktionen. Die nachfolgende Tabelle zeigt diese Verhältnisse.

Tabelle über die im Verlaufe der Versuchszeit mit der Anzahl der Pinselungen wechselnden Hautveränderungen:

Nr.	Anzahl der Pinselungen	Versuchszeit bis zum Tode	Histolog. Befunde in der Haut der Pinselungsstelle	Mastzellen
21	26	28 Tage	Kein Ca., kleines Papillom. Stellenw. Verlust d. Epithels, dafür breite hyalinisierte Gewebsstreifen, die bis zum subcut. Fettgewebe reichen.	gering
22	36	58 „	Praecancerös, vereinzelte Plattenepith.-Zellnester dringen bis ins subcut. Fettgewebe vor.	viele
19	43	65 „	Einige Zapfen dringen in d. Tiefe. Praecancerös, kleines Papillom.	breite Schicht

Nr.	Anzahl der Pinselungen	Versuchszeit bis zum Tode	Histolog. Befunde in der Haut der Pinselungsstelle	Mast-zellen
25	97	159 „	Ulcus, kein Ca., tiefe Abscesse bis in d. Skelett-muskulatur hinein.	fast keine
23	110	175 „	Miescher'sche Schläuche (Schmarotzer).	reichlich
26	131	209 „	Kein Oberflächenca.	mäßig viel
27	132	215 „	Kein Ca.	wenig
28	141	223 „	Kein Ca., schwielige Verdickungen d. Unterhaut-bindegewebes (Hypertrophie).	mäßig viel
29	174	302 „	Schwielige Bindegewebsverdickung mit breitem Leukocytenabwehrwall.	zahlreich
31	221	417 „	Ledigl. verdicktes Epith.	wenig

4 Tiere unter 20 Pinselungen wurden unberücksichtigt gelassen.
3 Tiere nach 225 Pinselungen mehrere Wochen ohne weitere Pinselungen beobachtet: Völlig reizlose Haut an der ursprünglichen Pinselungsstelle. Wiederholt gesetzte Brandwunden in der ursprünglichen Pinselungsstelle ergaben kein Carcinom. Nach einigen Wochen Brandnarbe und Pinselungsstelle völlig verheilt und reizlos. Tiere leben noch 2 Jahre nach Versuchsbeginn.

Was besagen diese Befunde nun bezüglich der gesuchten carcinogenen Stoffe? Das Auftreten praecanceröser Stadien kann das Vorhandensein krebserregender Stoffe im Urin nicht beweisen, denn solche Stadien brauchen sich eben nicht zu Krebsen zu entwickeln, andererseits ist das sehr rasche Auftreten dieser eindeutigen Epithelwucherungen doch sehr verdächtig und für weitere Suche ermutigend. Wir erklären unsere Befunde so, daß wir zwar in unserem Extrakt zunächst krebserregende Stoffe hatten, die in den ersten Wochen diese Stadien bewirkten, jedoch in dem lagernden Extrakt zugrunde gingen, so daß es nicht zu echten Krebsen kam. Daß ätherische Lösungen zerstörend wirken, ist ja bekannt. Wir versuchten nachträglich, das Vorhandensein solcher Zerstörungskräfte zu zeigen und

konnten eine solche Destruktion auch an zwei Beispielen tatsächlich nachweisen; während der frische Extrakt die geringen, dem Gehalt normalen Urins entsprechenden Follikulinmengen enthielt (getestet an der kastrierten Maus!), war am Ende des Versuchs jede östrogene Wirkung des Extrakts verschwunden. Außerdem fluoreszieren alle Äther- und Benzolextrakte von Krebsharnen (auch von Normalharn) ohne Ausnahme stark blau, wie wir in späteren Versuchen immer wieder feststellten. Dabei muß man sehr aufpassen, um nicht von außen eine zusätzliche Blaufluorescenz in den Äther oder in das Benzol hineinzubringen. Alter Äther fluoresziert schon von sich aus blau. Beim Schütteln des mit dem Daumen oder Gummi- oder Korkstöpsel verschlossenen Reagenzglases machen Stoffe von der Hautoberfläche usw. das Benzol fluorescieren. Die Blaufluorescenz des Urins wird also sehr leicht durch äußere Dinge vermehrt! Wir haben in anderen Versuchen, die wir noch schildern werden, bis jetzt vergeblich versucht, die Blaufluoreszenz normaler Urinextrakte zu verhindern. Obgleich anzunehmen ist, daß unser Erstextrakt blau fluoreszierte — wir haben es am Originalextrakt damals nicht geprüft, weil wir die Fluoreszenzversuche erst später aufnahmen —, war der Rest unseres Extraktes am Ende der Versuche ohne jegliche Blaufluoreszenz. Die Stoffe, die die blaue Fluoreszenz verursachen, waren also (ebenso wie das Follikulin) zerstört.

Die Notwendigkeit, die krebserregenden Stoffe an ihrer Wirkung, die ja nur mit sehr viel Material und sehr langsam zu erreichen ist, zu prüfen, macht die Untersuchung kostspielig und zeitraubend. Es wäre deshalb von unschätzbarem Vorteil, wenn es gelänge, physikalische oder chemische Anhaltspunkte zu finden, in welcher Harnfraktion Krebserreger zu vermuten sind. Obgleich diese Arbeiten endgültig natürlich nur von Chemikern ausgeführt werden können, die eben der Reihe nach alle überhaupt vorhandenen Stoffe chemisch aufklären müßten, versuchten wir die Carcinogene vielleicht an ihrer Blaufluoreszenz, die ja leicht festzustellen ist, auch im Harn der Krebspatientinnen nachzuweisen. Es zeigte sich aber sehr bald, daß schon alle Extrakte des Normalharns (Äther, Benzol, Butanol) intensiv blau fluoreszieren. Wir konnten aus den Literatur nicht feststellen, welche Stoffe diese normale Blaufluoreszenz bewirken. Wir haben zahlreiche Versuche unternommen, diese Blaufluoreszenz zu beseiti-

gen, mit dem Ziele, die normale Blaufluoreszenz von einer etwa von Carcinogenen stammende Fluoreszenz zu trennen. Wir benutzten Harn von Mäusen, denen Benzpyren unter die Haut gelegt war, als Testobjekt, denn in diesem Mäuseurin, der normaler Weise wie der Menschenurin Blaufluoreszenz zeigt, finden sich sehr wahrscheinlich blau fluoreszierende Benzpyrenabkömmlinge durch die normale Blaufluoreszenz verdeckt. Unsere Versuche haben noch nicht zu einem nennenswerten Ergebnis geführt. Durch Ansäuerung des Harns lassen sich die normalen Blaufluoreszenzstoffe viel besser und reichhaltiger extrahieren als in neutralem oder alkalischem Milieu. Absorptionsversuche mit Aluminiumhydroxyd, mit Kaolin und Bleifällung führten ebensowenig zu einer Trennung. Zwar war die Fluoreszenz oft unbeständig, oft wurde sie schwächer, aber die Harne von Benzpyrentieren und Normaltieren, von Krebspatientinnen und gesunden Menschen verhielten sich dabei jeweils gleich.

Mehr als Kuriosität wollen wir das Ergebnis einer Serie anführen: Wir hatten im Harn von Benzpyrenmäusen gefunden, daß sie bei sehr stark alkalischer Reaktion, wo ja normale Harne die geringste Fluoreszenz im Extrakt ergeben, am ehesten vermehrte Fluoreszenz gegenüber der Norm ergeben. Wir übertrugen diesen Befund auch auf Menschenharn und setzten also Harn von normalen Versuchspersonen und von Krebspatienten in Serien mit steigendem p_H von stark sauer bis stark alkalischer Reaktion an. Von einigen Nebenbefunden sei abgesehen. Die Harne von Krebspatienten zeigten in deutlichem Unterschied von den Normalharnen auf der alkalischen Seite immer stärker zunehmend eine äußerst intensive violette Fluoreszenz, die nun allerdings im Harn verblieb und sich nicht extrahieren ließ. Wir konnten sie auch vielmehr schon so nachweisen, daß wir den Krebsharn zuerst mit Benzol, Chloroform oder Butanol extrahierten und dann diesen klaren Extrakt mit starker Natronlauge ausschüttelten. Die klare Natronlauge erstrahlte dann vor der U.V-Lampe in leuchtendem Violett. Wir haben daraufhin den Urin von 20 normalen Versuchspersonen, meistens Studenten, untersucht; er zeigte solche Reaktion nie. Dagegen gaben alle Harne von Krebspatienten mit Alkali leuchtende violette Fluoreszenzen. Es war mit Sicherheit möglich, Krebsharn von Normalharn immer wieder zu unterscheiden. Aus der großen Intensität sah man direkt, daß be-

trächtliche Substanzmengen im Urin die Reaktion geben mußten. Aus der Anamnese der Patientinnen ergab sich dann auch, daß sie alle Mischpulver als Antineuralgica bekommen. Mit reiner Salicylsäure und Aspirin konnten wir die Reaktion ebenfalls erzeugen; zweifellos hatten wir diese Substanzen im Urin der Krebspatientinnen nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen, körpereigene Carcinogene nachzuweisen, haben wir noch einige Untersuchungen, z. T. nur orientierender Art, durchgeführt, die damit nur lose zusammenhängen, die wir aber trotzdem hier anfügen wollen: Im Harn von Krebspatienten haben wir den Follikulingehalt an der kastrierten Maus getestet. Es ist aus der Literatur bekannt, daß der Follikulingehalt im Harn von Krebspatienten gegenüber Normalharn nicht wesentlich vermehrt ist. Die Befunde der Literatur schwanken zwischen 10—90 M. E. pro Liter. Bekanntlich wird nun nur etwa der 100. Teil des tatsächlich ausgeschiedenen Follikulins durch die früher üblichen Extraktionsverfahren mit Lipoidlösungsmitteln erfaßt. Ein viel größerer Teil des Follikulins wird in einer biologisch fast unwirksamen veresterten Form, nämlich als Glukuronsäureester und wohl auch als andere Ester, ausgeschieden, die im Gegensatz zu freiem Follikulin in Lipoidlösungsmitteln unlöslich sind. Erst wenn der Extraktion eine sehr energische Säurehydrolyse des Urins vorausgeschickt wird, die Veresterung also wieder aufgehoben wird, werden auch diese Follikulinmengen erfaßt. Wenn also die Ausscheidung des wirksamen f r e i e n Follikulins bei Normal- und Krebsharn als gleich bekannt war, so untersuchten wir, ob nicht etwa bei Krebspatientinnen die Ausscheidung der g e b u n d e n e n Form erhöht wäre. Die Beantwortung dieser Frage war auch für den Zusammenhang zwischen Carcinogenen und Sexualhomonen nötig, denn die Carcinogene mit gleichzeitigem Sexualhormoncharakter suchten wir besonders in der gebundenen, also unwirksamen und entgifteten Fraktion. Eine Vermehrung der östrogenen Substanzen in dieser Fraktion hätte uns einen Hinweis gegeben, hier die carcinogene Wirkung zu suchen. Wir fanden nach einfacher Ätherextraktion des angesäuerten Urins auch im Mischharn von Krebspatienten nur geringe Follikulinmengen: 10-15 M. E. pro Liter, wie sie auch in normalen Harnen gefunden werden. Die Gesamtfollikulinmenge nach energischer Hydrolyse nach

den Vorschriften von Cohen und Marrian (15) ist von diesen Autoren für normalen Menschenharn auf das 100-fache der bisherigen Literaturwerte angegeben worden. Es finden sich auch in der Literatur Werte von einigen 100 M. E. Wir selbst prüften im Mischharn mehrmals Verdünnungen, die positive Resultate bei 1000 M. E. pro Liter Harn ergeben hätten; wir erhielten nie einwandfreie Schollenstadien. Auch in einigen gesonderten Portionen von Einzelpatienten in verschiedenen Krebsstadien fanden wir immer weniger als 1000 M. E. Auch gebundenes Follikulin findet sich also bei Genitalkrebs nicht nennenswert vermehrt.

Besprechung besonderer Zellformen in der Haut der Pinselungsstelle.

Bei der histologischen Untersuchung sowohl der Benzpyrentumoren als auch der Veränderungen in der mit Harnextrakt gepinselten Haut fielen uns im Bindegewebe der Umgebung des Krebses, beziehungsweise an der Pinselungsstelle, wenn noch kein Krebs sich entwickelt hatte, Zellen auf, die bei Eosin-Hämatoxylinfärbung von Paraffinschnitten als tief dunkelblau gefärbte Elemente erscheinen. Diese Zellen finden sich völlig regelmäßig in der Gegend der behandelten Hautstelle im ganzen subcutanen Bindegewebe in sehr großer Zahl, oft geradezu massenhaft. Sie nehmen im allgemeinen von der Epidermis gegen das tiefere Fettgewebe hin ab. In geringer Zahl treten sie jedoch, wenn auch lange nicht so regelmäßig, noch im Fettgewebe und auch zwischen den Muskelzellen auf. Jedoch findet sich auch davon abweichendes Vorkommen zum Beispiel in Zügen direkt über dem Fettgewebe bei sonstigem Fehlen im Bindegewebe, oder in einem Zuge genau in der Mitte zwischen Epidermis und Fettgewebe, oder auch nur direkt unter der Epidermis, alle Faltungn derselben mitmachend. Die Zellen treten bei der angegebenen Färbungsmethode durch ihre intensiv blau-schwarze Färbung geradezu wie Farbklexe hervor. Sie sind meist oval oder langgestreckt mit ihrer Längsachse parallel der Faserrichtung des umgebenden Gewebes, an anderen Stellen sind sie aber auch rund oder oft nach mehreren Seiten ausgezogen, wie wenn sie aufgespannt wären. Die Zellgrenze ist stets klar zu erkennen. Die Zellen sind größer als alle Bindegewebselemente ihrer Umgebung, etwa so groß wie kleine Fettzellen, nur im Gegensatz zu diesen stark angefärbt und dadurch vor allen übrigen Gewebs-

elementen auffallend. Bei normaler Färbung aller Zellen des übrigen Gewebes erscheinen sie im Falle der einfachen Eosin-Hämoxylinfärbung meist überfärbt als fast schwarze, in sich nicht differenzierbare Elemente, höchstens der Rand zeigt noch eine Differenzierung in einzelne Körner. Selbst bei schwächerer Färbung zeigen sich diese Zellen immer noch sehr intensiv mit Kernfarbstoff beladen. Der ganze Zelleib ist mit massenhaft tief dunklen, fast schwarzen Körnchen durchsetzt, um den Kern herum häuft sich diese Protoplasmakörnelung an, so daß Kern und Protoplasmakörnelung zu einer undurchsichtigen und undifferenzierbaren, mehr violetten Farbanhäufung verschmelzen. Die einzelnen Granula bleiben nur am Rande erkennbar, nach der Mitte der Zelle zu dagegen verschmilzt alles. Bei der großen Mehrzahl der Zellen ist so die Größe des Kerns nicht sicher festzustellen, weil eben der ganze Zelleib in der Farbe des Kerns angefärbt ist und das Ganze als große Kernmasse erscheint. (Nach einzelnen Zellbildern, in denen der Kern doch noch, wenn auch unter der Körnelung versteckt, zu erkennen ist, scheint in diesen Zellen mit intensivster Anfärbung aber doch der Kern nicht wesentlich größer als in den übrigen, also relativ klein, bei den meisten Zellen ist er auch absolut kleiner). Bei normaler Färbung, bei der die Zellen also nicht überfärbt sind, finden sich auch bei Eosin-Hämatoxylinfärbung regelmäßig noch zwischen der Mehrzahl der wegen zu starker Farbanhäufung schlecht in den Einzelheiten erkennbaren Zellen auch solche, bei denen über die ganze Zelle hin die einzelnen Granula getrennt erkennbar sind und an keiner Stelle miteinander verschmelzen. Nach Größe und Form gleichen diese Zellen völlig den zuerst genannten, es existieren auch alle möglichen Übergänge zwischen diesen beiden; von Zellen mit ganz wenigen Granula bis zur völligen Erfüllung des Protoplasmaleibs mit den Granula. Die Verschmelzung der gefärbten Granula zu einer Farbanhäufung findet sich nur bei Eosin-Hämatoxylinfärbung. Bei andern Färbemethoden bleibt stets Kern und Protoplasma gut unterschieden, die Granulierung erscheint viel spärlicher. Bei Giemsafärbung zeigen sich blau-violette Granula, mit Resorzin-Fuchsin blaues Protoplasma mit dunkelviolettem Kern; bei Ziehl-Neelsen tief dunkle Granula, nach Unna-Pappenheim kleine blau-violette Granula. Die Zellen machen nach ihrem ganzen Aussehen den Eindruck von „Abräumzellen“. Die weniger

granulierten sind offenbar als die jüngeren Stufen anzusehen, die stärkere, verklumpende Granulation als die ältere. Bei Färbung mit Methylen-Pyronin zeigen die Zellen die für Histiocyten charakteristischen roten Granula. Sie sind also als Mastzellen anzusprechen. Diese Zellen sind so auffallend und finden sich so regelmäßig im Bindegewebe unter jeder mit Benzpyren gepinselten Hautstelle und in deren Randgebieten auch vor der Entwicklung des eigentlichen Krebses, daß wir uns wunderten, diese Zellen in histologischen Beschreibungen des Benzpyrenkrebses nicht behandelt zu finden. Dagegen haben Bierich und Möller (16) sowie Möller (17) diese Zellen bei experimentellem Teerkrebs beschrieben und als große Wanderzellen beziehungsweise Mastzellen bezeichnet. Sie halten diese Wanderzellen nicht für Reaktionsprodukte auf den Teer, sondern auf hämosiderinhaltige andere Histiocyten, von denen noch zu sprechen sein wird. Daß wir die Zellen auch bei Reizung mit Benzpyrenpinselung fanden, beweist schon, daß sie auch ohne Beeinflussung durch den Gesamtteer entstehen können. Bei Pinselung mit unseren Harnextrakten fanden wir sie ebenfalls. Es war nicht anzunehmen, daß diese Bindegewebszellen nur auf carcinogene Reize gebildet würden, immerhin haben sie offenbar die Aufgabe irgendwelche Substanzen abzutransportieren; unter der mit carcinogenem Stoff gepinselten Haut könnten sie also diese carcinogenen Stoffe zum Abtransport aufnehmen. In ihnen müßten sich diese carcinogenen Stoffe dann anreichern und nachweisen lassen. Es war also zu untersuchen, ob sie bei Reizung durch Carcinogene irgendwie im Aussehen oder in der Anordnung sich anders verhielten und ob sie das gepinselte Carcinogen enthielten. Die Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop ergab, daß bei Pinselung von Benzpyren, das intensiv blau fluoresziert, in diesen Mastzellen Benzpyren in der fluoreszierenden Form nicht nachzuweisen ist, dagegen läßt sich ein diffuses Eindringen des Benzpyrens von der Oberfläche aus in die Epidermis nachweisen.

Wir haben nun Mäuse mit verschiedenen Carcinogenen und mit nicht carcinogenen Stoffen gepinselt, so zunächst mit Benzol allein, weil Benzol ja als hauptsächlichstes Lösungsmittel für solche Pinselungsversuche verwendet wird, ferner mit 1% α-Naphtylamin, 1% β-Naphtylamin, 1% Phenanthren und mit 0,5% Methylcholanthren, jeweils in Benzol gelöst. Davon ist β-Naphtylamin als Erreger des

sogenannten Anilin-Blasenkrebses bekannt, es macht bei Tierpinselung keine Hautkrebse, wohl aber — wahrscheinlich in Form besonderer Ausscheidungsprodukte — auch bei Tieren Blasengeschwülste; α-Naphtylamin gilt als nicht carcinogen, Phenanthren ist bei chemischer Verwandtschaft zu Benzpyren sicher nicht carcinogen, Methylcholanthren ist der stärkste bisher bekannte Krebserreger im Pinselungstest. Mit allen Substanzen, auch mit reinstem Benzol allein, wurden bei oft völlig unveränderter Epidermis diese Mastzellen im Bindegewebe unter der Pinselungsstelle gefunden. Bei 2maliger Pinselung pro Woche wurden jeweils 3 Mäuse nach 14, 18 und 26maliger Pinselung untersucht. Die Mastzellen finden sich dabei unabhängig von den 3 gewählten Pinselungsterminen und unabhängig von mehr oder weniger ausgesprochenen Epidermisveränderungen. Im Ganzen ist die Anzahl der Mastzellen aber bei Benzpyren- und Methylcholanthrenpinselung, die entsprechend ihrer carcinogenen Wirkung natürlich schon nach 14maliger Pinselung heftige Epithelreaktionen, wenn auch keine Krebse, zeigten, sicher größer. Die übrigen Stoffe ergaben bei 2maliger Pinselung pro Woche gar keine oder höchst geringe Epithelveränderungen. Entsprechend sind auch im Bindegewebe die Anzahl der Mastzellen geringer, sie erscheinen auch kleiner, die Körnelung erscheint manchmal nicht so fein, sondern gröber. Bei allen gepinselten Substanzen finden sich also sicher jeweils Mastzellen. Es läßt sich aber kein faßbarer Unterschied zwischen den Mastzellen bei Pinselung mit Carcinogenen und nicht carcinogenen Stoffen feststellen. Diese Plasmazellen werden also sehr wahrscheinlich nicht durch die gepinselten Substanzen selbst angelockt, sondern durch sekundäre, vermutlich aus Zellzerfall stammende Produkte. Trotz der Abwesenheit einer nennenswerten Fluoreszenz ist also trotzdem auch eine Beseitigung des gepinselten Stoffes selbst denkbar. Auf die Deutung dieser Mastzellen als Reaktionsprodukte auf hämosiderinhaltige Zellen nach B i e r i c h und M ö l l e r kommen wir noch zurück.

Außer diesen Mastzellen finden sich noch in den Präparaten von mit Benzpyren gepinselten Hautstellen echte Pigmentzellen. Das braunschwarze, in ungefärbten Schnitten mehr gelb-braune Pigment findet sich in sonst unveränderten Zellen, selten im Epithel, hauptsächlich in Bindegewebszellen und zwar besonders direkt unter dem Epithel, nicht in den ersten, aber in den nächst anschließenden Binde-

gewebszellschichten. Oft sind diese Pigmentzellen auch über das ganze Bindegewebe zerstreut, finden sich aber stets an einer Stelle vermehrt, an den andern viel weniger. In einigen Präparaten zeigt ein Teil dieser Pigmentzellen Beziehung zu kleinen Kapillaren. Es handelt sich um hämosiderinhaltige Histiozyten, die positive Eisenreaktion geben. Der Großteil der Pigmentzellen enthält aber einen anderen Farbstoff, der keine Eisenreaktion gibt, sich durch Wasserstoffsuperoxyd bleichen läßt und durch Chloroform allmählich extrahiert wird. Die Mehrzahl der Zellen enthält also ein braunes Pigment, das nicht Hämosiderin ist. Wir fanden diese Zellen bei Benzpyrenkrebs nicht beschrieben. Die Deutung der die Eisenreaktion gebenden Pigmentzellen als hämosiderinhaltige Histiocyten ist nicht zu bezweifeln. Wir finden jedoch nicht, wie B i e r i c h und M ö l l e r, die zuerst genannten Mastzellen als Reaktionsprodukte auf diese hämosiderinhaltigen Zellen, denn die Mastzellen finden wir zwar manchmal einzeln oder zu mehreren an Pigmentzellen gelagert, sowohl an hämosiderinhaltige als auch an solche mit eisenfreiem Pigment; die große Mehrzahl der Mastzellen steht aber nicht in Verbindung mit irgendwelchen Pigmentzellen. Die Pigmentzellen kommen in Haufen vor, an denen sich die Mastzellen nicht beteiligen. Außerdem kommen die Mastzellen bei Pinselung mit nicht carcinogenem Stoff in Präparaten vor, wo keinerlei Pigmentzellen, auch nicht einzelne zu finden sind, wo außerdem bei der kaum feststellbaren Epithelveränderung auch nur kapilläre Blutungen ins Bindegewebe der Umgebung nicht anzunehmen sind. Die Mastzellen setzten also das Vorkommen hämosiderinhaltiger Zellen nicht voraus, offenbar finden sich diese hämosiderinhaltigen Zellen bei Teerpinselung mit ihren viel stärkeren Nebenwirkungen auch viel häufiger als bei mit Benzpyren gepinselter Haut.

B i e r i c h und M ö l l e r deuten die zweite Art von Pigmentzellen, deren Pigment keine Eisenreaktionen gibt, auf Grund dieser Reaktion als teerpartikelhaltige Histocyten. Sie weisen darauf hin, daß verdünnter Teer unter dem Mikroskop aussehe, wie das Pigment ihrer Histiocyten. Sie halten darnach den Zellinhalt für phagocytierten Teer, wobei sie es offen lassen, daß es sich um den aktiven Anteil des Teers handeln könnte. Zweifellos lag bei T e e r pinselung die Annahme am nächsten, daß es sich um aufgenommene Teerpartikelchen handeln könte, wenn auch dem Hinweis auf ähnliches Aussehen ver-

dünnter Teerlösung wenig Beweiskraft zugesprochen werden konnte. Wir finden nun aber bei Pinselung mit klarer, fast völlig farbloser, nur 0,5%iger Benzpyrenlösung in reinstem Benzol ebenfalls solche Pigmentzellen, für die Teerpartikelchen natürlich von vornherein ausscheiden. Das Pigment fluoresziert nicht. Es handelt sich daher anscheinend nicht um einfach von außen aufgenommenes, körperfremdes Material, sondern um Reaktionsprodukte der Zellen auf den Reiz der Pinselung. Es gibt also solches Pigment, das sicher unter dem Reiz des Benzpyrens in den Bindegewebszellen der sonst albinotischen Maus gebildet wurde. Bei Teerpinselung, über die wir keine eigene Erfahrung besitzen, dürfte wohl, sowohl die Teeraufnahme wie die Pigmentbildung vorkommen, zumal sich dort nach Bierich und Möller auch im Epithel viele „pigmenthaltige" Zellen finden, während sie bei uns vorwiegend im Bindegewebe liegen und nur ganz vereinzelt im Epithel. Dagegen finden sie sich auch bei uns an der Grenze zum Rete Malpighii, wo ja auch die ersten morphologischen Änderungen zu krebsiger Entartung auftreten. Dieses Vorkommen der Pigmentzellen in der Gegend des Rete Malpighii hat die genannten Autoren schon zu dem Hinweis veranlaßt, sie könnten die ersten krebsigen Veränderungen bewirken, wenn nun außerdem nach unseren Untersuchungen unter dem Reiz des Carcinogens pigmentbildende Zellen in dem albinotischen Tier entstehen, so könnte in dieser Entstehung einer neuen Zellrasse eine Parallele zur Krebsbildung gesehen werden. Es ergab sich also die Frage, ob diese Zellen mit der Krebsbildung etwas zu tun haben. In Randgebieten von Spontantumoren der Maus (Mammacarcinom) fanden sie sich nie. Unsere Harnextrakte ergaben, wenn auch viel weniger regelmäßig und weniger ausgeprägt, gelegentlich doch auch ganz typisch die gleichen Pigmentzellen, das Vorkommen von Carcinogen darin ist aber ebenfalls möglich. Pinselungen mit sicher nicht carcinogenen Stoffen, so mit reinem Benzol, mit Phenanthren, α- und β-Naphtylamin ergaben bei dem oben näher aufgeführten Pinselungsverfahren bis zu 26 Pinselungen nur in einem Falle nach 22 Benzolpinselungen typisches, braunes, nicht hämoglobinogenes Pigment, während bei Benzpyrenpinselung beinahe jeder Schnitt, fast jeden Präparates solche Zellen zeigt. Auch diese Pigmentzellen sind also für krebserregende Stoffe nicht spezifisch, wenn sie auch in mit Benzpyren oder Methylcholanthren gepinselter Haut viel schneller und häufiger auftreten.

Zusammenfassung.

Es wurde über Versuche berichtet, aus dem Harn von krebskranken Frauen Stoffe mit krebserregender Wirkung nachzuweisen. Aus 500 Liter Harn wurde eine Ätherfraktion gewonnen, die nach 36—43 maliger Pinselung im Laufe von 58—65 Tagen präcanceröse Stadien erzeugte, wie sie mit aktiven Teerextrakten erst nach längerer Versuchszeit erzielt werden. Echte Krebse waren nicht zu erzielen. Die histologischen Bilder werden beschrieben, ebenso histologische Änderungen der übrigen Organe.

Der Genitalcyklus der Maus, bei der experimentell ein Benzpyrenkrebs erzeugt wird, ist vor und während der Entstehung des Krebses weder verkürzt noch verlängert.

Bei Patientinnen mit Uteruskrebs findet sich „freies" und „gebundenes" Follikulin in Konzentrationen von weniger als 1000 M. E. pro Liter.

Bei der experimentellen Krebserzeugung auftretende Mastzellen und Pigmentzellen wurden eingehend untersucht und ihre Bedeutung besprochen. Ihre Deutung als Reaktionsprodukte auf hämosiderinhaltige Zellen durch andere Autoren wird abgelehnt. Ferner werden Pigmentzellen beschrieben, die sich bei der sonst albinotischen Maus im Bindegewebe der Umgebung einer mit carcinogenen Stoffen gepinselten Hautstelle finden. Ihre Deutung als Teerpartikel scheidet bei der völligen Abwesenheit von Teer aus.

Herrn Dr. H. O. Kleine und Herrn Dr. H. Nothdurft sagen wir für ihre zahlreichen Hilfeleistungen bei der theoretischen und praktischen Durchführung der Arbeit herzlichen Dank.

Literaturangabe.

1. Kennaway u. Hieger: 1929 Brit. emd. Journal 1044 (1930) Kennaway, Cook u. a. Nature 1935, S. 318.
   Cook u. Mitarbeiter: Proc. Roy. Soc. London, zahlreiche Aufsätze 111—117. 1932—1935.
   J. W. Cook: Chemische Beiträge zum Krebsproblem. Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft 1936, 69. Jahrg., Nr. 3 A, S. 38.
2. Yamagiva u. Ichikava: Mitteilg. d. med. Fakultät der kaiserl. Universität Tokio 1915—1919.
3. Fiebiger: Zeitschrift f. Krebsf. 13, 217 (1913), 14, 295 (1914).
4. Teutschländer: Zeitschr. f. Krebsf. 30, 573, (1930).
5. Aschoff, Borst u. a. in zahlreichen Arbeiten.
6. Bloch u. Widmer: Arch. f. Dermatol. 152, 529, (1920).
7. Shear M. J.: Americ. Journ. Cancer 26, 322, (1936).
8. Roffo A. H.: Dtsch. med. Wo. 1937/1267.
9. Schürch O. u. Winterstein A.: Z. B. Zeitschr. f. Krebsf. 42, 76, (1935); Zeitschr. f. Krebsf. 46, 414, (1937).
10. Domagk: Zeitschr. f. Krebsf. 44, 160, (1936).
11. Schürch O. u. Winterstein: Zeitschr. f. physiol. Chemie 236, 79 ff.
12. Bürger M. u. Uiker R.: Kli. Wo. 1937, 334.
13. Achelis J. D. u. Nothdurft H.: Pflüg. Arch. 250 im Druck.
14. Brock, Duckrey u. Hamperl: Arch. Exp. Path. u. Pharm. 189, 709, (1938).
15. Cohen u. Marrian: Biochemic. Journ. 29, 1577, (1937).
16. Bierich u. Möller E.: Münch. med. Wo. 1921, 1361.
17. Möller E: Zeitschr. f. Krebsf. 19, 393, (1923).

Lebenslauf.

Ich bin am 20. Dezember 1913 in Langenbrücken bei Bruchsal geboren. Ich besuchte dort 5 Jahre lang die Volksschule und trat an Ostern 1926 in die Sexta des Realgymnasiums in Waldshut ein. Infolge einer Versetzung meines Vaters mußte ich 1929 in die Oberrealschule in Lörrach überwechseln, wo ich dann Ostern 1933 das Abitur machte. Vom Sommersemester 1933 bis zum Sommersemester 1938 studierte ich Medizin, alle 11 Semester an der Universität Heidelberg. Am 22. September 1938 bestand ich in Heidelberg das medizinische Staatsexamen. Vom 1. Oktober 1938 bis 31. Januar 1939 war ich in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik in Heidelberg als Medizinalpraktikantin tätig und seit 1. Febr. 1938 arbeite ich als Praktikantin in der Augenklinik Heidelberg.

Lisa Nothdurft.

Lebenslauf.

Am 8. Oktober 1913 wurde ich in Ludwigshafen am Rhein geboren. Ich besuchte dort die Volksschule und trat 1924 in die Oberrealschule ein, wo ich im März 1933 das Abitur machte. Von März bis Oktober 1933 war ich im Freiwilligen Werkhalbjahr für Abiturienten. Im November begann ich in Heidelberg Medizin zu studieren. Nachdem ich noch in Breslau, München und Frankfurt a/M. studierte, legte ich nach 10 Semestern am 15. Februar 1939 das Staatsexamen in Heidelberg ab.

Paul Pfau.